



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> : <b>C12Q 1/68, C07H 21/04, C12P 19/34</b>	<b>A1</b>	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 96/34980</b> (43) Date de publication internationale: 7 novembre 1996 (07.11.96)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/00650 (22) Date de dépôt international: 29 avril 1996 (29.04.96) (30) Données relatives à la priorité: 95/05264                      3 mai 1995 (03.05.95)                      FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): LAURENT, Claudine [FR/FR]; 15, avenue de la Fouilleuse, F-92210 Saint-Cloud (FR). MALLET, Jacques [FR/FR]; 18, rue Charcot, F-75013 Paris (FR). MELONI, Rolando [IT/FR]; 2, square Moncey, F-75009 Paris (FR). (74) Mandataire: LOBJOIS, Françoise; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond-Aron, F-92165 Antony Cédex (FR).		(81) Etats désignés: AL, AU, BB, BG, BR, CA, CN, CZ, EE, GE, HU, IS, JP, KP, KR, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, TR, TT, UA, US, UZ, VN, brevet ARIPO (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.          Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>
(54) Title: METHOD FOR DIAGNOSING SCHIZOPHRENIA		
(54) Titre: METHODE DE DIAGNOSTIC DE LA SCHIZOPHRENIE		
(57) Abstract		
<p>The present invention relates to a method for diagnosing schizophrenia, said method being based on the detection in vitro of the presence of the allele Ep of the microsatellite HUMTH01 in the gene TH. The invention also relates to the primers used for implementing said method.</p>		
(57) Abrégé		
<p>La présente invention concerne une méthode de diagnostic de la schizophrénie basée sur la détection in vitro de la présence de l'allèle Ep du microsatellite HUMTH01 dans le gène TH. L'invention concerne également les amorces utilisées pour la mise en œuvre de cette méthode.</p>		

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brésil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

## METHODE DE DIAGNOSTIC DE LA SCHIZOPHRENIE

La présente invention concerne une méthode de diagnostic de la schizophrénie. Elle concerne plus particulièrement un procédé de détection de variations dans une séquences répétées d'ADN présente dans le gène TH, dont  
5 certaines formes apparaissent spécifiquement dans les patients schizophréniques. L'invention concerne également des amorces utilisables pour le détection d'allèles spécifiques de cette séquence répétée, associées à la schizophrénie.

La présence de mutations dans toutes les classes de séquences répétées d'ADN est un phénomène connu. Cependant, la signification fonctionnelle de ces  
10 mutations est indéterminée. Ainsi, les microsatellites représentent une classe abondante de séquences répétées d'ADN qui présentent un grand polymorphisme lié à des variations dans le nombre de motifs répétés (ref 1) et/ou dans la séquence de ces motifs. Ces microsatellites ont pour cette raison été utilisés comme marqueurs  
15 génétiques pour la construction de cartes génétiques et pour l'identification de loci impliqués dans des pathologies (ref 2). La taille des différents allèles d'un microsatellite dépend de variations dans le nombre de motifs répétés. Des expériences de séquençage de dimères répétés ont ainsi permis de montrer une variation dans le nombre de motifs  
20 répétés et dans leur séquence. Ces variations peuvent correspondre notamment à des répétitions "parfaites", c'est-à-dire sans interruption dans la séquence de bases, ou à des répétitions "imparfaites", contenant une ou plusieurs interruptions dans la séquences des motifs, qu'il s'agisse de délétion(s) ou d'insertion(s) (ref 3). De la même façon, des variations de longueur et/ou de séquence ont également été observées dans les motifs trimériques ou tétramériques répétés. Ainsi, des variations de ce type ont été  
observées dans les microsatellites HUMHPRTB (ref 4) et HUMTH01 (ref 5).

25 La demanderesse s'est intéressée plus particulièrement à la recherche d'altérations génétiques liées à la schizophrénie. A cet effet, la demanderesse a réalisé une étude d'association entre le gène de la tyrosine hydroxylase (TH) et la schizophrénie, orientée plus particulièrement sur le microsatellite HUMTH01. La TH est l'enzyme limitante de la voie de biosynthèse des catecholamines. Différentes études

génétiques des pathologies psychiatriques et neurologiques ont été réalisées utilisant des marqueurs localisés dans le gène TH (ref 6 et 7). Cependant, jusqu'à présent, il n'existe dans la littérature aucune démonstration d'une association génétique avec la schizophrénie.

5 Le microsatellite HUMTH01 est localisé dans le premier intron du gène de la tyrosine hydroxylase. Ce microsatellite est constitué de motifs tétramériques TCAT répétés. Il présente un certain polymorphisme, différents allèles ayant été décrits possédant des nombres de motifs répétés variables. L'allèle le plus souvent rencontré comporte 10 motifs répétés et une délétion d'une paire de base dans le cinquième motif  
10 répété, qui comporte la séquence CAT.

La demanderesse a ainsi examiné l'implication du gène TH dans la schizophrénie, en recherchant la présence de variations de séquence et de longueur dans le microsatellite HUMTH01. Les résultats obtenus ont permis de montrer que l'allèle parfait étaient très rare, et présent uniquement chez les patients schizophrènes.  
15 Ces résultats ont été reproduits sur des populations de patients d'origine ethnique différente. Ainsi, sur une population française de 239 sujets dont 94 malades de schizophrénie, 6 allèles différents, désignés A, B, C, D, Ei et Ep, ont été détectés. Ces différents allèles diffèrent les uns des autres de 4 paires de bases (1 motif complet), à l'exception des deux plus longs qui diffèrent d'une seule paire de bases. Le séquençage  
20 de ces différents allèles a permis de montrer que le motif répété du microsatellite HUMTH01, de séquence TCAT, est parfaitement répété dans les allèles A, B, C et D, qui contiennent respectivement 6, 7, 8 et 9 motifs répétés. En revanche l'allèle E, qui comporte 10 motifs répétés, présente dans la majorité des cas la même délétion d'une thymidine dans le cinquième motif répété. Cette délétion conduit à un allèle imparfait  
25 de séquence (TCAT)4(CAT)(TCAT)5, désigné Ei (pour imparfait). L'allèle Ei est l'allèle le plus fréquent dans la population caucasienne (ref 5). Au contraire, l'allèle E parfait de séquence (TCAT)10 (désigné Ep) est très rare. Ainsi, sur l'ensemble de la population de schizophrènes testée, seuls 5 patients possédaient l'allèle parfait. Les résultats obtenus montrent de manière inattendue que tous les sujets portant l'allèle Ep  
30 sont des patients schizophrènes, alors que cet allèle est absent de 145 témoins sains

(Cf table 1). Ces résultats démontrent une association hautement significative entre la présence de l'allèle Ep et la schizophrénie. En outre les 5 patients schizophrènes porteurs de l'allèle Ep sont des cas sporadiques de schizophrénie dont le subtype clinique est une schizophrénie paranoïde dans un cas, une schizophrénie indifférenciée dans 3 cas et une schizophrénie désorganisée dans 1 cas.

La demanderesse a ensuite étendu cette étude à une autre population d'origine ethnique différente. Ainsi, une étude d'association similaire a été entreprise sur une population de 88 tunisiens. Les résultats obtenus montrent que la fréquence des différents allèles A-E rencontrés dans la population tunisienne testée est significativement différente de celle observée dans la population française (Cf tableau 1). Pourtant, seulement 4 individus se sont avérés être porteurs de l'allèle parfait Ep, tous étant des patients schizophrènes (1 schizophrénie paranoïde et 3 schizophrénies indifférenciées) les formes étant là aussi des formes sporadiques.

Ces résultats constituent la première démonstration d'une association entre la TH et la schizophrénie. Ils montrent clairement que l'allèle parfait Ep du microsatellite HUMTH01 de séquence (TCAT)<sub>10</sub> peut être associé de manière significative à la schizophrénie et constitue de ce fait un outil génétique de dépistage de ce type de pathologie.

La spécificité de l'association de cet allèle à la schizophrénie a en outre été confirmée par une étude sur une population de 100 patients atteints de psychose maniaco-dépressive sporadique. La présence de l'allèle Ep n'a été détectée dans aucun de ces patients.

La mise en évidence de l'association entre cet allèle et la schizophrénie offre de nombreuses applications, dans le domaine diagnostique et thérapeutique. Ainsi, la présente invention offre maintenant, pour la première fois, la possibilité de diagnostiquer la schizophrénie par un test biologique et non plus exclusivement par des arguments cliniques. Un objet de la présente invention réside plus particulièrement dans une méthode de diagnostic de la schizophrénie consistant à détecter la présence de l'allèle Ep du microsatellite HUMTH01 dans le gène TH. Cette méthode est

également applicable au diagnostic des pathologies du spectre de la schizophrénie, telles que notamment la schizotypie, les individus schizoïdes, etc. L'invention permet ainsi d'affiner les critères de diagnostic de ces pathologies, qui sont aujourd'hui uniquement de nature clinique. En outre, l'invention permet également de mettre en  
5 évidence des prédispositions à ce type de trouble psychiatrique, par identification d'une vulnérabilité génétique dans les familles de patients porteurs de cet allèle Ep. D'un point de vue thérapeutique, l'invention permet de manière avantageuse de définir des traitements médicaux plus appropriés en fonction du type de schizophrénie. En confirmant l'hypothèse d'une implication de la voie des catécholamines, l'invention  
10 permet d'utiliser des thérapies plus ciblées. En outre, si les implications fonctionnelles de la présence de l'allèle Ep ne sont pas définitivement établies, il est à noter que le microsatellite HUMTH01 est localisé dans le premier intron du gène TH, région dans laquelle il a été démontré un épissage alternatif conduisant à 4 isoformes de la TH (ref 8). Il est donc possible que des variations génétiques dans cette région affectent la  
15 régulation de l'expression du gène TH, et que cela soit lié à l'apparition de la schizophrénie.

Selon un premier aspect, l'invention concerne donc une méthode de diagnostic de la schizophrénie caractérisée par la détection in vitro de la présence de  
20 l'allèle Ep du microsatellite HUMTH01 dans le gène TH. La mise en évidence de cet allèle, de séquence (TCAT)<sub>10</sub>, est caractéristique de certaines schizophrénies. L'absence de cet allèle n'exclut pas l'existence d'une schizophrénie, cet allèle étant rencontré dans 5% des cas environ. Le procédé de l'invention est également applicable à la caractérisation génétique de schizophrénies, et au sous-typage de schizophrénie. Comme indiqué précédemment, l'allèle Ep ne semble présent que dans des  
25 schizophrénies sporadiques. Le procédé de l'invention est également applicable la mise en évidence de prédisposition à la schizophrénie.

Dans le procédé de l'invention, la détection de l'allèle Ep peut être réalisée par différentes techniques. Parmi les techniques utilisables, on peut citer préférentiellement le séquençage, la séparation sur gel ou encore la technique de SSCP.

Concernant le séquençage, toute méthode connue de l'homme du métier peut être utilisée. Notamment, il est avantageux d'utiliser un séquenceur automatique d'ADN. Le séquençage est préférentiellement effectué sur des matrices double-brin par la méthode de terminaison de chaînes en utilisant des amorces fluorescentes. Un kit approprié à cet effet est le kit de séquençage Taq Dye Primer Kit de chez Applied Biosystem (Applied Biosystem, Foster City CA). Le séquençage du microsatellite HUMTH01, ou plus précisément d'un fragment isolé portant ce microsatellite, permet directement de connaître l'allèle présent chez le patient et ainsi de mettre en évidence la présence ou non de l'allèle Ep de séquence (TCAT)<sup>10</sup>. Les résultats obtenus par séquençage sont présentés sur la figure 2 par exemple.

Une technique préférée pour la mise en évidence de l'allèle Ep est la séparation sur gel. Cette technique présente l'avantage de permettre la discrimination entre les différents allèles en fonction de leur taille, sans qu'il soit nécessaire de séquencer les fragments d'ADN. Cette technique repose sur la migration, en condition dénaturante, des fragments d'ADN dénaturés dans un gel d'acrylamide (de préférence à 6%). La révélation des bandes peut être réalisée par toute technique connue de l'homme du métier, basée par exemple sur l'emploi d'amorces marquées (notamment en  $\gamma$  sur le phosphore), sur l'introduction d' $\alpha$ -dCTP dans les fragments testés, sur l'emploi  $\alpha$  (alpha) de sondes froides, sur une révélation au bromure d'éthidium, ou encore par hybridation (blot) avec une sonde radiomarkée. Un protocole précis de séparation sur gel est donné à titre illustratif dans les exemples. Comme indiqué sur la figure 3, cette technique permet, rapidement et sans séquençage, de distinguer entre les allèles A, B, C, D, Ei et Ep du microsatellite.

Concernant la technique d'identification par SSCP, il s'agit également d'une méthode de séparation sur gel d'acrylamide, mais en condition non dénaturante. Cette technique permet de discriminer les différents fragments en fonction de leur conformation (Cf exemples).

Le procédé de l'invention est réalisé sur un échantillon d'ADN du patient. Cet échantillon doit contenir au moins le microsatellite HUMTH01. Il contient préférentiellement tout ou partie du premier intron du gène TH. Encore plus

préférentiellement, il comporte un fragment du gène TH contenant le microsatellite HUMTH01 bordé de séquences flanquantes. L'échantillon d'ADN à tester peut être obtenu à partir de cellules prélevées au patient. Il s'agit préférentiellement de cellules sanguines (cellules mononucléées par exemple), qui sont aisément obtenues par simple

5 prélèvement sanguin. D'autres types cellulaires peuvent être utilisés tels que notamment les fibroblastes, les cellules épithéliales, les kératinocytes, etc. L'ADN est ensuite extrait des cellules, et utilisé pour la détection de l'allèle Ep. Pour cela, l'ADN génomique obtenu peut être digéré par des enzymes de restriction, cloné dans des vecteurs appropriés, sélectionné pour la TH par exemple ou par hybridation avec une

10 sonde correspondant au premier intron de la TH, puis analysé comme décrit ci-dessus. De manière tout a fait préférée, l'ADN extrait est préalablement soumis à une ou plusieurs réactions d'amplification afin d'obtenir une quantité importante de matériel correspondant à la région portant le microsatellite HUMTH01. L'amplification peut être réalisée par toute technique connue de l'homme du métier, et notamment par la

15 technique dite de PCR [Polymérase-catalyzed Chain Reaction, Saiki R.K. et al., Science 230 (1985) 1350-1354; Mullis K.B. et Faloona F.A., Meth. Enzym. 155 (1987) 335-350]. A cet égard, l'amplification peut être effectuée en utilisant un "DNA thermal cycler" (Perkin Elmer Cetus) selon les spécifications du fabricant. Les conditions de température et de milieu utilisées pour l'amplification sont les conditions

20 générales telles que décrites par exemple dans Maniatis et al., 1989. Des conditions spécifiques sont également données dans les exemples. Pour la mise en oeuvre de la présente invention, il est avantageux d'utiliser un fragment d'ADN portant le microsatellite HUMTH01 de taille suffisamment petite. Ceci permet avantageusement une discrimination entre les allèles sans devoir recourir au séquençage. En outre, si des

25 expériences controle de séquençage sont réalisées, il est également préférable de n'avoir à séquencer que des fragments de taille limitée. Avantageusement, le fragment d'ADN utilisé est un fragment amplifié d'une taille inférieure à 300 pb. Ce fragment porte le microsatellite HUMTH01 et des séquences flanquantes du gène TH, telles que représenté sur la figure 1. Encore plus préférentiellement, le fragment amplifié

30 comprend moins de 200pb. Des résultats particulièrement remarquables ont été obtenus avec des fragments amplifiés d'une taille inférieure à 160 pb, et même à 100



pb. A cet effet, la présente invention décrit également des amorces spécifiques permettant l'amplification de fragments d'ADN de petite taille portant le microsatellite HUMTH01. Ainsi, l'invention décrit en particulier 3 couples d'amorces permettant respectivement l'amplification de fragments de 192pb, 156pb et 77pb. La séquence de ces amorces est donnée dans les exemples, ainsi que la séquence et la position sur le gène TH du fragment amplifié. Toute autre amorce permettant l'amplification d'un fragment de moins de 300pb portant au moins le microsatellite HUMTH01 et une région flanquante, dérivée de la séquence présentée sur la figure 1 fait également partie de la présente invention. Avantageusement, les amorces selon l'invention ont une longueur comprise entre 10 et 40 mer et, de préférence, entre 15 et 30 mer. La séquence de ces amorces peut être déterminée à partir de la séquence donnée dans la figure 1, en fonction de la taille du fragment amplifié, de sa localisation autour du microsatellite, et de la longueur choisie des amorces.

Les amorces utilisées dans le cadre de l'invention peuvent être synthétisées selon toute technique connue de l'homme du métier, et notamment en utilisant la chimie des phosphoramidites, éventuellement protégés en 5' par un groupement cyanoéthyl, (Sinha *et al.*, 1984, Giles 1985), avec un synthétiseur automatique d'ADN tel que le synthétiseur Applied Biosystem modèle 394, (Applied Biosystem, Foster City CA), selon les recommandations du fabricant. Les amorces peuvent également être marquées par toute technique connue de l'homme du métier.

L'échantillon d'ADN à tester peut être un ADN génomique, un ADNc, ou également un ARN. Il s'agit plus préférentiellement du produit d'amplification de l'ADN génomique amplifié au moyen d'amorces spécifiques telles que décrites ci-avant.

Un autre objet de l'invention concerne une trousse de détection de l'allèle Ep comprenant un couple d'amorce telles que définies ci-avant. Cette trousse est avantagement une trousse de diagnostic de la schizophrénie.

Comme indiqué précédemment, la présente invention fournit pour la première fois une méthode génétique de détection et de caractérisation génétique des maladies

du spectre de la schizophrénie. Outre les applications diagnostic mentionnées, cette méthode offre également des potentialités thérapeutiques importantes, liées notamment à un meilleur ciblage du traitement en fonction de l'affection concernée.

5 La présente invention sera décrite plus en détail à l'aide des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

### Liste des Figures

Figure 1 : Séquence d'une partie du premier intron du gène TH incluant le microsatellite HUMTH01. La position des amorces d'amplification est indiquée.

10 Figure 2 : Mise en évidence par séquençage de l'allèle Ep du microsatellite HUMTH01.

Figure 3 : Mise en évidence par séparation sur gel de l'allèle Ep du microsatellite HUMTH01.

Table 1 : Distribution des allèles du microsatellite HUMTH01 dans les populations testées atteintes ou non de schizophrénie.

### 15 Exemples

#### 1. Préparation de l'ADN

Les échantillons de sang ont été collectés sur héparine et les cellules mononucléées isolées sur gradient Ficoll hypaque (Pharmacia, Upsala, Suède). L'ADN a ensuite été extrait selon les techniques standard. Pour une extraction directe de  
20 l'ADN, le protocole suivant a été utilisé :

25 Le sang récolté a été versé dans des tubes de 50 ml et du tampon de lyse a été ajouté pour faire éclater les hématies (TAMPON LYSE= 40 ml TRIS HCl 1N pH 7.5 + 20 ml EDTA 0,5M + H<sub>2</sub>O milliQ qsp 2 L), volume final : 50 ml. La suspension est ensuite centrifugée 15 min à 2500 rpm à 4°C; le surnageant est jeté, 50 ml de tampon de lyse sont à nouveau ajoutés au culot. La même opération (centrifugation, élimination du surnageant, reprise du culot dans le tampon de lyse) est répétée deux fois. A l'issue de ces 3 centrifugations, le culot est récupéré.

On ajoute alors :      5 ml de tampon de lyse (pour 5ml de sang au départ)  
                             125 µl de lauryl sarkosyl 20 %  
                             50 µl de proteinase K (20 ng/ml)

5      La solution obtenue est mélangée et mise au bain marie agitant à 55°C pendant la nuit.

10      Le lendemain matin, 2 volumes d'ethanol 95 % sont ajoutés (si 5 ml --> 15 ml terminal), puis la solution est précipitée par inversion jusqu'à la formation d'un flocon. L'ADN est alors récupéré à l'aide d'une pipette P1000 (avec le bout du cône coupé) dans un tube de 5 ml. On ajoute ensuite de l'ethanol 80 % et on place le mélange dans un réfrigérateur. Le lendemain matin l'ethanol est changé puis, le soir, l'alcool est retiré et on laisse sécher le flocon (le tube est posé à l'envers sur un kleenex).

L'ADN est alors repris avec du TE 1X; suivant la grosseur du flocon la quantité de TE varie de 200 µl à 1 ml. On laisse toute la nuit sur machine rotative à 37°C puis la concentration d'ADN est déterminée par spectrométrie.

15      2. Population française :

20      94 patients d'origine différente, atteints de schizophrénie chronique (62 hommes et 32 femmes, âge moyen 42+/-12.3) incluant 21 cas familiaux ont été étudiés. Le diagnostic a été formulé selon le critère DSM III (ref 9) en utilisant les données provenant des tableaux médicaux et d'interview directes suivant la traduction française du Tableau des Désordres Affectifs et de l'Anxiété Schizophrénique (SADS-LA, ref 10). A chaque patient a été attribué un sous-type clinique selon la procédure décrite. 145 témoins non apparentes ont été étudiés (84 hommes et 61 femmes; âge moyen 48+/-8.3), ne présentant aucun désordre psychiatrique.

3. Population tunisienne :

25      44 patients d'origine différente, atteints de schizophrénie chronique (33 hommes et 11 femmes, âge moyen 37+/-8.2) incluant 13 cas familiaux ont été étudiés. Le diagnostic a été formulé selon le critère DSM IIIR (ref 11) en utilisant les données provenant des

tableaux médicaux. Ces patients ont été comparés à 44 patients contrôle, sans liens entre eux (37 hommes et 7 femmes ; âge moyen 35+/-5.9), ne présentant aucun désordre psychiatrique.

#### 4. Amorces utilisées pour les réactions d'amplification

5        La matrice ciblée pour les réactions d'amplification est composée de l'allèle Ep du microsatellite HUMTH01, dont la séquence est (TCAT)<sub>4</sub>TCA(TCAT)<sub>5</sub>. Le microsatellite est localisé à la position 1070 de la séquence du gène TH tel que publiée et accessible dans Genbank (n° D00269).

10       Différents couples d'amorces ont été utilisées pour l'amplification par PCR. Ces couples sont donnés ci-dessous ainsi que la taille du fragment amplifié. La position de ces amorces sur la séquence du gène TH est donnée dans la figure 1 (voir également SEQ ID n° 1).

##### Couple A:

- 1) 5' GGC AAA TAG GGG GCA AAA 3'(sens) (SEQ ID n° 1) et  
15 2) 5' TTA TCC AGC CTG GCC CAC 3'(antisens) (SEQ ID n° 2),  
La longueur d'amplification prévue est de 192 pb.

##### Couple B:

- 3) 5' GGC AAA TAG GGG GCA AAA 3'(sens) (SEQ ID n° 3) et  
4) 5' GGC TTC CGA GTG CAG GTC 3'(antisens) (SEQ ID n° 4).  
20 La longueur d'amplification prévue est de 156 pb.

##### Couple C:

- 5) 5' GTT CCT CCC TTA TTT CCC 3'(sens) (SEQ ID n° 5) et  
6) 5' AGG GAA CAC AGA CTC CAT 3' (antisens) (SEQ ID n° 6).  
La longueur d'amplification prévue est de 77 bp

#### 25 5. Protocole des réactions d'amplification

Le mélange utilisé pour la réaction de PCR contient: 40 ng d'ADN génomique préparé selon l'exemple 1, 200 mM de chaque dATP, dCTP, dGTP et dTTP, 18 pmol

(100 ng) de chaque amorce, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,5), 1.5 mM MgCl et 1.0 mCi ( $\alpha$ - $^{32}$ P) dCTP (Amersham, UK) dans un volume final de 15 ml.

Après une dénaturation initiale de 3 min à 96°C, 0.75 unités de Taq Polymérase sont ajoutées à chaque échantillon (ADN+mix) à 92°C, cette étape est suivie par 30 cycles comprenant une d'hybridation pendant 30" à 56°C, une élongation pendant 30" à 72°C et une dénaturation pendant 30" à 92°C.

#### 6. Séparation sur gel

Trois microlitres du produit de la réaction de PCR mélangés à 3 microlitres de "stop solution" (0.025 de bleu de bromophénol et 0.025 de xylène cyanol, 0.95 de formamide désionisée) sont chargés dans un gel dénaturant (6 % Acrylamide/Bisacrylamide 19:1). Après migration électrophorétique (2500 volts, 55 mA), le gel est démoulé et séché. Il est mis en cassette (sans écran amplificateur) avec un film XOMAT (Kodak) pour autoradiographie et exposé pendant la nuit à température ambiante.

#### 7. Protocole pour la réaction de PCR-SSCP

Cette réaction a été réalisée en plusieurs étapes selon le protocole suivant :

1- Amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) de la séquence cible d'ADN (150-200 pb) avec marquage radioactif des deux brins (utilisation de  $\alpha$   $^{32}$ P-ATP) ou d'un seul brin (kination d'une des amorces avec  $\gamma$   $^{32}$ P-ATP).

Un ml de produit PCR est mélangé avec 2,5 ml de tampon de charge (80 % formamide deionisée, 50 mM TBE, 1 mM EDTA, 0.5 % Xylène-Cyanol, 0.5 % Bleu de Bromo-Phenol).

2- Dénaturation de l'ADN à 96 °C pendant 3-5 min.

3- Refroidissement rapide des échantillons dans la glace fondante.

4- Dépôt rapide dans un gel non-dénaturant de polyacrylamide (6 % Acryl/Bisacrylamide 37.5:1, 0,5X TBE).

5- Migration électrophorétique à 4°C et à 50W ou à température ambiante et à 10W (avec 10 % glycerol dans le gel).

6- Autoradiographie du gel séché.

TABLE 1

FRANCE \*\*

TUNISIE

ALLELE	CONTROLES <sup>a</sup>	SCHIZOPHRENES <sup>b</sup>	CONTROLES <sup>a</sup>	SCHIZOPHRENES
A (tcat)6	54 (18.6 %)	40 (21.3 %)	20 (22.7 %)	18 (20.5 %)
B(tcat)7	54 (18.6 %)	43 (22.9 %)	20 (22.7 %)	20 (22.7 %)
C(tcat)8	38 (13.1 %)	18 (9.6 %)	14 (15.9 %)	8 (9.1 %)
D(tcat)9	52 (17.9 %)	23 (12.2 %)	21 (23.9 %)	26 (29.5 %)
EI(tcat)4cat(tcat)5	92 (31.8 %)	58 (30.8 %)	13 (14.8 %)	12 (13.6 %)
Ep(tcat)10	0 (0%)	6** (03.2 %)	0 (0 %)	4 (4.6 %)

12

Liste de Références

1. Weber et al., Am. J. Hum. Genet. 44(1989)388
2. Hearne et al., Trends Genet. 8 (1992) 288
3. Weber et al., Genomics 7 (1990) 524
- 5 4. Edwards et al., Genomics 12 (1992) 241
5. Puers et al., Am.J. Hum. Genet. 53 (1993) 953
6. Craddock et al., Ann. of Medecine 25 (1993) 317
7. Leboyer et al., Lancet 335 (1990) 1219
8. Grima et al., Nature 326 (1987) 707
- 10 9. American Psychiatric Association, Diagnostic and Statistical Manual of mental disorders (3rd Edn) - Washington, DC = APA (1980).
10. Fyer et al., Anxiety Disorders clinic, New-York : New-York State Psychiatric Institute (1985).
11. American Psychiatric Association, Diagnostic and Statistical Manual of mental disorders (3rd Edn revised) - Washington, DC = APA (1987).
- 15

## LISTE DE SEQUENCES

## (1) INFORMATIONS GENERALES:

5

## (i) DEPOSANT:

(A) NOM: RHONE-POULENC RORER S.A.

(B) RUE: 20, avenue Raymond ARON

(C) VILLE: ANTONY

10

(E) PAYS: FRANCE

(F) CODE POSTAL: 92165

15

(ii) TITRE DE L'INVENTION: METHODE DE DIAGNOSTIC DE LA SCHIZOPHRENIE

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 7

## (iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

20

(A) TYPE DE SUPPORT: Tape

(B) ORDINATEUR: IBM PC compatible

(C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS

(D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

25

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

30

(A) LONGUEUR: 18 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: double

(D) CONFIGURATION: linéaire

35

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON



15

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

GGCAAATAGG GGGCAAAA

18

5

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

10

(A) LONGUEUR: 18 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: double

(D) CONFIGURATION: linéaire

15

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

20

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

TTATCCAGCC TGGCCCAC

18

25

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 18 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

30

(C) NOMBRE DE BRINS: double

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

35

(iv) ANTI-SENS: NON

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

GGCAAATAGG GGGCAAAA

18

## 5 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 18 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

10 (C) NOMBRE DE BRINS: double

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

15 (iv) ANTI-SENS: NON

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

20

GGCTTCCGAG TGCAGGTC

18

## 25 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 5:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 18 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

30 (C) NOMBRE DE BRINS: double

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

35 (iv) ANTI-SENS: NON

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

17

GTTCTCCTCCCT TATTTCCC

18

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 6:

5

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 18 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: double

10

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

15

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

20 AGGGAACACA GACTCCAT

18

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 7:

25

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 636 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: double

30

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

35

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

CTTGAATCTT AACGATCGGA ATGTGGAAAC AAATCCATCC AAAAAATCCA AGATGGCCAG 60

AGGTCCCCGG CTGCTGCACC CAGCCCCCAC CCTACTCCCA CCTGCCCCTG CCTCCCTCTG 120

CCCCAGCTGC CCTAGTCAGC ACCCCAACCA GCCTGCCTGC TTGGGGAGGC AGCCCCAAGG 180

5 CCCTTCCCAG GCTCTAGCAG CAGCTCATGG TGGGGGGTCC TGGGCAAATA GGGGGCAAAA 240

TTCAAAGGGT ATCTGGGCTC TGGGGTGATT CCCATTGGCC TGTTCCCTCCC TTATTTCCCT 300

10 CATTCATTCA TTCATTCA TTTCATTCA TTTCATTCA ATGGAGTCTG TGTTCCCTGT 360

GACCTGCACT CGGAAGCCCT GTGTACAGGG GACTGTGTGG GCCAGGCTGG ATAATCGGGA 420

GCTTTTCAGC CCACAGGAGG GGTCTTCGGT GCCTCCTTGG GCACTCAGAA CCTTGGGCTC 480

15 CCTGGCACAT TTAAAATGGG TTTTATTTA TGGACCTTGA TTGAAATGTG GTGTGAGTTG 540

TAGCAGTGTC ATTTCCAGGT ACCTTCTCAG GGACACAGGG CGCCCTCCCC CGTCCTCCCC 600

20 CGCCCTCCCC TACCCTCCCC CACCAGGCTC CCCATC 636

REVENDICATIONS

1. Méthode de diagnostic de la schizophrénie caractérisée en ce que l'on détecte in vitro de la présence de l'allèle Ep du microsatellite HUMTH01 dans le gène TH.
2. Méthode selon la revendication 1 caractérisée en ce que la détection de l'allèle Ep est réalisée par séquençage et/ou par séparation sur gel et/ou par SSCP.
3. Méthode selon la revendication 2 caractérisée en ce que la détection de l'allèle Ep est réalisée par séparation sur gel.
4. Méthode selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce que la détection est réalisée sur l'ADN extrait du patient.
5. Méthode selon la revendication 4 caractérisée en ce que l'ADN est extrait à partir de cellules mononucléées.
6. Méthode selon la revendication 4 ou 5 caractérisée en ce que l'ADN est amplifié préalablement à la détection.
7. Méthode selon la revendication 4 caractérisée en ce que l'ADN amplifié comprend tout ou partie du premier intron du gène TH.
8. Méthode selon la revendication 7 caractérisée en ce que l'ADN amplifié est un fragment d'une taille inférieure à 300 pb portant le microsatellite HUMTH01 et des séquences flanquantes.
9. Méthode selon la revendication 8 caractérisée en ce que l'ADN amplifié est un fragment d'une taille inférieure à 200pb et, de préférence, inférieure à 160 pb.
10. Couple d'amorces permettant l'amplification d'un fragment de moins de 300pb portant au moins le microsatellite HUMTH01 et une région flanquante.

11. Couple d'amorces selon la revendication 10 caractérisée en ce que les amorces ont une longueur comprise entre 10 et 40 mer, de préférence entre 15 et 30 mer.
12. Couple d'amorce selon la revendication 11 caractérisée en ce qu'il est choisi parmi le couple A comportant les amorces SEQ ID n° 1 et 2; le couple B comportant les  
5 amorces SEQ ID n° 3 et 4 et le couple C comportant les amorces SEQ ID n° 5 et 6.
13. Trousse de détection de l'allèle Ep du microsatellite HUMTH01 comprenant un couple d'amorce selon la revendication 10.
14. Trousse selon la revendication 13 pour le diagnostic de la schizophrénie.
15. Méthode selon la revendication 1 pour la caractérisation génétique de  
10 schizophrénies.
16. Méthode selon la revendication 1 pour la mise en évidence de prédisposition à la schizophrénie.

1/3

CTTGAATCTT AACGATCGGA ATGTGGAAAC AAATCCATCC AAAAAATCCA  
AGATGGCCAG AGGTCCCCGG CTGCTGCACC CAGCCCCCAC CCTACTCCCA  
CCTGCCCCCTG CCTCCCTCTG CCCCAGCTGC CCTAGTCAGC ACCCCAACCA  
GCCTGCCTGC TTGGGGAGGC AGCCCCAAGG CCCTTCCCAG GCTCTAGCAG  
CAGCTCATGG TGGGGGGTCC TG<sup>1,3</sup>GGCAAATA GGGGGCAAAA TTCAAAGGGT  
ATCTGGGCTC TGGGGTGATT CCCATTGGCC T<sup>5</sup>GTTCCCTCCC TTATTTCCCT  
CATTCATTCA TTCATTCATT CATTCATTCA TTCATTCACC  
ATGGAGTCTG TGTTCCCT<sup>6</sup><sub>GT</sub> GACCTGCACT CGGAAGCC<sup>4</sup><sub>CT</sub>  
GTGTACAGGG GACTGTGTGG GCCAGGCTGG ATAA<sup>2</sup>TCGGGA GCTTTTCAGC  
CCACAGGAGG GGTCTTCGGT GCCTCCTTGG GCACTCAGAA CCTTGGGCTC  
CCTGGCACAT TTAAAATGGG TTTTATTTA TGGACCTTGA TTGAAATGTG  
GTGTGAGTTG TAGCAGTGTC ATTTCCAGGT ACCTTCTCAG GGACACAGGG  
CGCCCTCCCC CGTCCTCCCC CGCCCTCCCC TACCCTCCCC CACCAGGCTC  
CCCATC

Figure 1

2/3

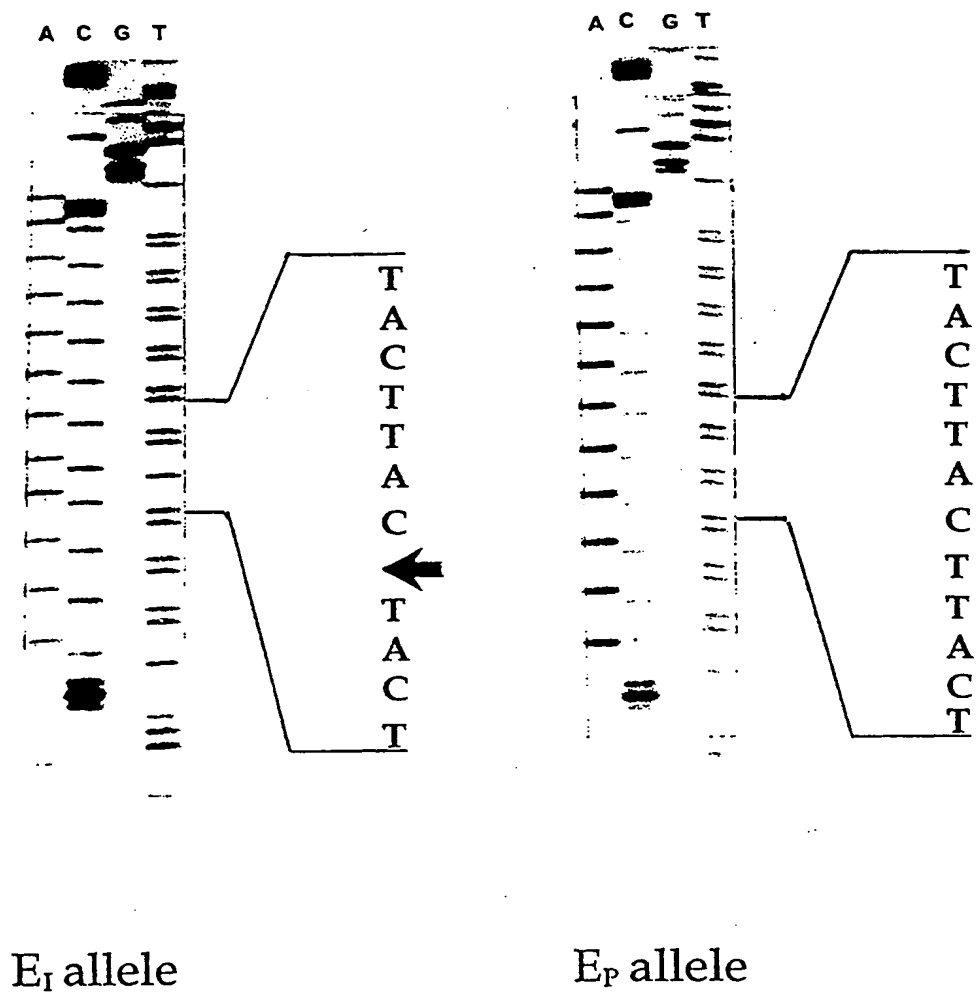


Figure 2



3/3

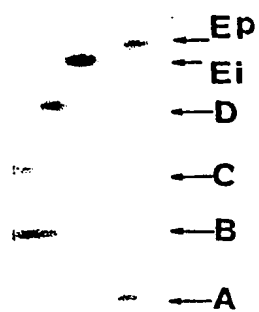


Figure 3

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 96/00650A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 C12Q1/68 C07H21/04 C12P19/34

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	C.R. ACAD SCI SER III, vol. 318, no. 7, July 1995, pages 803-9, XP002012400 MELONI, R. ET AL.: "a rare allele of a microsatellite located in the tyrosine hydroxylase gene found in schizophrenic patients" see the whole document ---	1-16
A	THE LANCET, vol. 345, April 1995, page 932 XP002012401 MELONI, R. ET AL.: "association of maniac-depressive illness with tyrosine hydroxylase microsatellite marker." see the whole document --- -/--	1,4-13

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

3 September 1996

Date of mailing of the international search report

13. 09. 96

Name and mailing address of the ISA  
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Osborne, H

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 96/00650

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>GENOMICS , vol. 12, 1992, pages 241-53, XP002012402 EDWARDS, A. ET AL: "genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human populations" cited in the application see table 1</p> <p>---</p>	1,4-13
A	<p>WO,A,94 03640 (GOVERNMENT OF THE UNITED STATES (US) ) 17 February 1994 see page 48, line 1 - line 20 see page 15; table 1</p> <p>---</p>	1,4-13
A	<p>PSYCHIATRIC GENETICS, vol. 3, no. 1, 1993, pages 29-31, XP002012403 BYERLEY, W. ET AL: "tyrosine hydroxylase gene not linked to schizophrenia in nine pedigrees" see the whole document</p> <p>---</p>	1,15,16
T	<p>PSYCHIATRIC GENETICS, vol. 5, no. 2, 1995, pages 83-88, XP002012404 WEI, J. ET AL: "association of polymorphic VNTR region in the first intron of the human TH gene with disturbances of the catecholamine pathway in schizophrenia" see the whole document</p> <p>-----</p>	1-16

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int. Application No

PCT/JP 96/00650

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9403640	17-02-94	US-A- 5369004	29-11-94
		AU-B- 4794693	03-03-94
		CA-A- 2141414	17-02-94
		EP-A- 0666928	16-08-95
-----			

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem internationale No

PCT/FR 96/00650

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 6 C12Q1/68 C07H21/04 C12P19/34

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12Q

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
T	C.R. ACAD SCI SER III, vol. 318, no. 7, Juillet 1995, pages 803-9, XP002012400 MELONI, R. ET AL.: "a rare allele of a microsatellite located in the tyrosine hydroxylase gene found in schizophrenic patients" voir le document en entier ---	1-16
A	THE LANCET, vol. 345, Avril 1995, page 932 XP002012401 MELONI, R. ET AL.: "association of maniac-depressive illness with tyrosine hydroxylase microsatellite marker." voir le document en entier ---	1,4-13
	-/--	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

## \* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

3 Septembre 1996

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

13. 09. 96

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Osborne, H

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>GENOMICS , vol. 12, 1992, pages 241-53, XP002012402 EDWARDS, A. ET AL: "genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human populations" cité dans la demande voir tableau 1</p> <p>---</p>	1,4-13
A	<p>WO,A,94 03640 (GOVERNMENT OF THE UNITED STATES (US) ) 17 Février 1994 voir page 48, ligne 1 - ligne 20 voir page 15; tableau 1</p> <p>---</p>	1,4-13
A	<p>PSYCHIATRIC GENETICS, vol. 3, no. 1, 1993, pages 29-31, XP002012403 BYERLEY, W. ET AL: "tyrosine hydroxylase gene not linked to schizophrenia in nine pedigrees" voir le document en entier</p> <p>---</p>	1,15,16
T	<p>PSYCHIATRIC GENETICS, vol. 5, no. 2, 1995, pages 83-88, XP002012404 WEI, J. ET AL: "association of polymorphic VNTR region in the first intron of the human TH gene with disturbances of the catecholamine pathway in schizophrenia" voir le document en entier</p> <p>-----</p>	1-16

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs à nombre de familles de brevets

Der internationale No

PCT/FR 96/00650

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9403640	17-02-94	US-A- 5369004	29-11-94
		AU-B- 4794693	03-03-94
		CA-A- 2141414	17-02-94
		EP-A- 0666928	16-08-95
-----			